

Docket No.: 61352-055

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of	:	Customer Number: 20277
	:	
Nobuhiko OZAKI, et al:	:	Confirmation Number:
	:	
Serial No.:	:	Group Art Unit:
	:	
Filed: October 28, 2003	:	Examiner: Unknown
	:	
For: METHOD OF FIXING CELL	:	

**CLAIM OF PRIORITY AND
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT**

Mail Stop CPD
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

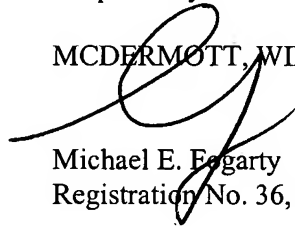
In accordance with the provisions of 35 U.S.C. 119, Applicants hereby claim the priority of:

Japanese Patent Application No. 2002-313063, filed October 28, 2002

cited in the Declaration of the present application. A certified copy is submitted herewith.

Respectfully submitted,

MCDERMOTT, WILL & EMERY



Michael E. Fogarty
Registration No. 36,139

600 13th Street, N.W.
Washington, DC 20005-3096
(202) 756-8000 MEF:tlb
Facsimile: (202) 756-8087
Date: October 28, 2003

61352-055
OZAKI et al.
October 28, 2003

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 0 月 2 8 日
Date of Application:

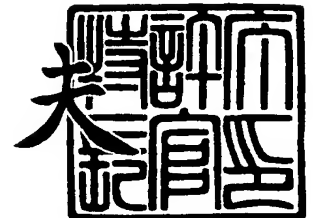
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 1 3 0 6 3
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 1 3 0 6 3]

出 願 人 松 下 電 器 産 業 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 3 年 8 月 1 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 4 8 2 0



【書類名】 特許願

【整理番号】 2033840173

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12M 3/04
G03F 7/26

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 尾崎 亘彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 岡 弘章

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065868

【弁理士】

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【弁理士】

【氏名又は名称】 高石 ▲さとる▼

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【弁理士】

【氏名又は名称】 古川 安航

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100110951

【弁理士】

【氏名又は名称】 西谷 俊男

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100114834

【弁理士】

【氏名又は名称】 幅 慶司

【電話番号】 078-321-8822

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006220

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0101410

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体試料の固定化方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体試料を基体表面の所望の領域に固定化する方法であって

- (a) 基体表面の一部にマスク層を形成するマスク層形成工程、
 - (b) 前記マスク層形成工程の後、生体試料を基体表面とマスク層表面とからなる固定化媒体最表面に固定化する固定化工程、
 - (c) 前記固定化工程の後、前記マスク層を基体から分離する工程、
- を有する生体試料の固定化方法。

【請求項 2】 前記マスク層形成工程が、基体表面をマスク材料で被覆する工程と、基体表面の一部に被覆されたマスク材料を除去する工程とからなる請求項 1 に記載の生体試料の固定化方法。

【請求項 3】 前記マスク材料が感光性を有し、前記マスク材料を除去する工程がマスク層の露光及び現像により所望のパターンを実像化する工程である請求項 2 に記載の生体試料の固定化方法。

【請求項 4】 前記マスク層が、処理条件に応じて基体から分離できるマスク材料で形成されており、

前記処理条件が、マスク層周囲の雰囲気条件である請求項 1 に記載の生体試料の固定化方法。

【請求項 5】 前記処理条件が、マスク層周囲の雰囲気の pH 及び／又は温度の条件である請求項 4 に記載の生体試料の固定化方法。

【請求項 6】 前記マスク層形成工程の後であり、かつ、前記固定化工程の前に、該マスク層を加熱し前記生体試料に対し有害な物質を気化させる工程を有する請求項 1 に記載の生体試料の固定化方法。

【請求項 7】 前記固定化工程において、前記生体試料が、生体試料の固定化を容易及び／又は強固にする固定化材を介して固定化媒体最表面に固定化される請求項 1 に記載の生体試料の固定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】**【発明の属する技術分野】**

本発明は、生体試料の固定化方法に関するものであり、更に詳しくは、基体表面の所望の領域に生体試料を固定化する生体試料の固定化方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

近年、生命科学分野における研究の急速な発展に伴い、細胞、細胞小器官、タンパク質、核酸、リン脂質等の生体試料の活性、機能、構造に関してミクロ的な解明が要求されている。また、これらの解明に伴い、生体試料の電気素子への適用をはじめとした、各種デバイスへの適用の可能性の検討、DNAチップ、プロテインチップ等のスクリーニング技術への応用の検討が活発に行われている。各種デバイスとしては、バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、ニューロコンピュータ、DNAコンピュータなどが挙げられる。

【0003】

上記、生体試料のミクロ的な解明、これらを素子として用いるデバイス技術またはスクリーニング技術いずれにおいても生体試料をその機能を維持した状態で所望の微小領域に固定化する技術が技術発展・普及の端緒となりうる。

【0004】

例えば、本出願人は、細胞または組織に障害を与えることなく、細胞の電気生理的活動の観察を安定かつ長期間行うことを可能とした電極を備えた細胞外電位測定装置に関し出願を行った（例えば、特許文献1、特許文献2参照）。

【0005】

神経細胞などが活動する際には、活動電位が発生する。この活動電位は、神経細胞のイオン透過性の変化に伴って細胞膜内外のイオン濃度が変化し、これに伴って細胞膜電位が変化することによって生じる。上記電極は、電極上に細胞を固定化して、神経細胞近傍のイオン濃度の変化に伴う電位変化を測定することによって、神経細胞の活動を観察することができるものである。かかる電極においても、電極を備えた基板上の電極表面のみに細胞を固定化する技術が所望されてい

る。電極表面のみに確実に細胞を固定化することにより、各細胞の活動電位を測定でき、さらには、細胞間の相互作用を全ての細胞の電気生理的計測結果から測定することが可能となる。

【0006】

プロテインチップや、DNAチップにおいては、所望の領域のみに試料を固定化できれば、複数種の生体試料を複雑に固定化したチップの作製が可能となり、より高度なスクリーニングが可能となる。さらに、所望の微小領域にタンパク質やDNAを固定化できれば、一度に多くの条件をスクリーニングできる。

【0007】

また、生体試料を電気素子として用いた回路設計において、生体試料を所望の微小領域に固定化できれば、微小かつ複雑な回路設計が可能となる。

【0008】

生体試料をその機能を維持した状態で基板上の所望の領域に固定化することは非常に難しく、しかも所望の領域が微小である場合にはさらなる困難を伴うものであった。

【0009】

従来、細胞を所望の領域に固定化する方法として、細胞を接着させようとする領域には、細胞接着性高分子を存在させ、そうでない領域には細胞非接着性高分子を存在させることにより細胞を所望の領域に固定化させる方法が知られている（例えば、特許文献3参照）。また、金属穴空きマスクを基板上に置き、物理的に細胞を定着する領域を限定する方法が知られている（例えば、非特許文献1参照）。また、帯電ドラムを用いて、静電作用により細胞をパターンニングする方法が知られている（例えば、特許文献4参照）

【0010】

【特許文献1】

特開平6-78889号公報

【特許文献2】

特開平6-296595号公報

【特許文献3】

特公平 7 - 5 1 0 6 1 号公報

【非特許文献 1】

Yasuhiko Jimbo et al. Simultaneous Measurement of Intracellular Calcium and Electrical Activity from Paterned Neural Networks in Culture. IEEE Transaction on Biomedical Engineering Vol.40、No.8 PP.804-810、1993.

【特許文献 4】

特公平 2 - 2 4 5 1 8 1 号

【0 0 1 1】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、細胞接着性高分子と細胞非接着性高分子を用いることにより所望の領域に細胞を固定化する方法のような表面改質に伴う細胞の配列のパターニングは、境界領域が不鮮明で、そのため、微小な領域を選択して細胞を接着させることが困難である。また、金属穴あきマスクを用いた方法においては、手作業でなされるマスクの除去の際に細胞を剥がしてしまうなどの問題があり、十分な方法とはいえない。さらに、帯電ドラムを用いた方法においては、ドラム形状に合う基板のみしか用いることができず、また装置も大掛かりになってしまうという欠点を有する。

【0 0 1 2】

上記のように、従来の技術は、高精度で所望の微小領域に生体試料を固定化する方法として十分なものはなかった。

【0 0 1 3】

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、微小であったり複雑なパターンの領域であっても生体試料を高精度に固定化できる生体試料の固定化方法を提供することを目的とする。

【0 0 1 4】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、微細加工技術を生体試料の固定化に応用することにより、従来困難であった、高精度で所望の微小領域に生体試料を固定化できることを見出し

た。本発明は、これらの知見に基づいて完成された。

【0015】

本発明は、生体試料を基体表面の所望の領域に固定化する方法であって、（a）基体表面の一部にマスク層を形成するマスク層形成工程、（b）前記マスク層形成工程の後、生体試料を基体表面とマスク層表面とからなる固定化媒体最表面に固定化する固定化工程、（c）前記固定化工程の後、前記マスク層を基体から分離する工程、とを含み、かつ、前記マスク層は、処理条件に応じて基体から分離できるマスク材料で形成されることを特徴とする生体試料の固定化方法を提供するものである。本発明に用いられる生体試料として、細胞、細胞小器官の他、タンパク質、核酸、リン脂質等が挙げられる。

【0016】

好ましくは、前記マスク層形成工程が、基体表面をマスク材料で被覆する工程と、基体表面の一部に被覆されたマスク材料を除去する工程とからなる。

【0017】

好ましくは、前記マスク材料が感光性を有し、前記マスク材料を除去する工程が、マスク層の露光及び現像により所望のパターンを実像化する工程である。

【0018】

好ましくは、前記処理条件は、マスク層周囲の雰囲気条件である。

【0019】

好ましくは、前記処理条件は、マスク層周囲の雰囲気の pH 及び／又は温度の条件である。

【0020】

好ましくは、前記マスク層形成工程の後、前記固定化工程の前に、該マスク層を加熱し前記生体試料に対し有害な物質を気化させる工程を有する。

【0021】

好ましくは、前記固定化工程において、前記生体試料が、生体試料の固定化を容易及び／又は強固にする固定化材を介して固定化媒体最表面に固定化される。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下、本発明をより詳細に説明する。

【0023】

第1の実施形態

図1を用いて本発明の第1の実施形態である生体試料の固定化方法を説明する。本実施形態においては、生体試料を固定化する基体として基板を用いる。図1は、本発明の生体試料の固定化方法を模式的に示す図である。本発明に用いられる生体試料として、細胞、細胞小器官、タンパク質、核酸、リン脂質等が挙げられる。

【0024】

まず、図1(b)に示すように、基板1表面の一部の領域101にマスク層12を形成する。基板1表面の一部の領域101にマスク層12を形成する方法としては、図1(a)に示すように基板1表面全体にマスク材料を塗布してマスク層12を形成した後、基板1表面の領域100に対応するマスク層12の一部を除去することにより形成することができる。マスク材料としては、好適には感光性材料を用いることができる。ポジティブ型の感光性材料を用いる場合は、領域100に対応するマスク層12のみを露光し、一方、ネガティブ型の感光性材料を用いる場合は、領域101に対応するマスク層12のみを露光する。露光後、現像することにより、領域100に対応するマスク層12のみを除去することができる。かかる工程における露光及び現像は、常法に従って行うことができる。

【0025】

マスク層12の材料に、生体試料に有害な成分が含まれている場合は、マスク層12形成の後、かかる有害成分を除去する処理を行うことが好ましい。例えば、有害な成分が加熱により気化する場合は加熱処理を行うことが好ましい。

【0026】

次に、図1(c)に示すように、基板1表面と、マスク層12表面とからなる固定化媒体最表面に生体試料6を固定化する。

【0027】

生体試料6の固定化媒体最表面への固定化には、公知の方法を用いることができる。以下、その一例を説明する。まず、基体1表面に枠等を固定して、溶液を

保持できるようにする。そして、固定化対象の生体試料 6 が細胞である場合は、固定化媒体最表面を固定化材 7 でコートし、培養液を入れ、さらに細胞を播種すると、付着性細胞が、固定化媒体最表面に自然に固定される。生体試料 6 がタンパク質や核酸である場合には、枠内を緩衝液で満たし、適当な条件下で架橋剤を用いてタンパク質や核酸を固定媒体最表面に固定化する。

【0028】

本明細書でいう固定化材 7 とは、生体試料 6 の固定化を容易及び／又は強固とするものをいう。固定化材 7 は生体試料 6 に応じて任意に選択できる。

【0029】

例えば、生体試料 6 が細胞である場合は、固定化材 7 として、細胞接着性のタンパク質であるコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン等のマトリクス材料、強塩基性もしくは強酸性官能基を持つ高分子、具体的には、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリオルニチン（PO）、ポリリジン（PL）等の正荷電性ポリマー、あるいはこれらの材料の組み合わせを用いることができる。また、生体試料 6 がタンパク質や核酸である場合は、固定化材 7 として、基体 1 表面への吸着性がよく固定対象の生体試料との結合性が高い公知の自己組織化単分子膜（self-assembled monolayer）を用いることができる。自己組織化単分子膜を用いると、生体試料の高密度・高配向な固定化を簡便に達成することができる。

【0030】

その他の固定化材 7 として、生体試料 6 がタンパク質である場合には、かかるタンパク質と親和性の相互作用を有するタンパク質（生体試料のタンパク質を抗原とする抗体等）を用いることができる。

【0031】

生体試料 6 を固定化した後、図 1（d）に示すように、領域 101 に対応するマスク層 12 を基板 1 から分離する。分離方法としては、マスク層 12 の材料に応じて適切な方法を用いることができるが、生体試料の機能に影響を与えない方法で分離することが望ましい。例えば、マスク層 12 周囲の雰囲気（例えば pH、温度）の条件を変化させ、所定時間放置することによりマスク層 12 が基板 1

から自発的に剥離するような方法が望ましい。その他、特に基板 1 と接する部分を含むマスク層 12 を一部溶解するような条件下で処理することにより分離する方法が挙げられる。

【0032】

マスク層 12 を基板 1 から分離する工程においては、基体 1 表面の所望の領域 100 外に固定化された生体試料 6 は、マスク層 12 とともに基板 1 上から分離されることになる。以上の方法により、基板 1 上の所望の領域のみに生体試料 6 を固定化することが可能となる。

【0033】

尚、上記に例示したように、マスク材料として感光性材料を用い、マスク層 12 の形成工程において半導体技術などに用いられるリソグラフィによる微細加工技術を応用することにより、微小かつ複雑な領域に生体試料 6 を固定化することが可能となる。

【0034】

基板 1 としては、固定化した生体試料の用途等に応じて任意のものを用いることができる。例えば、固定化した生体試料を電気生理的計測の対象として用いる場合には、電極及び配線が形成された基板を用い（第二の実施形態で示す）、固定化した生体試料を顕微鏡の観察対象とする場合には、透明な基板を用いるとよい。

【0035】

第 2 の実施形態

本実施形態は、電極を備えたセンサ基板表面の電極上に細胞を固定化する固定化方法に係るものである。上記センサ基板は、細胞外電位の測定に適した構成のものであればいずれであっても本実施形態の細胞の固定化方法を用いて細胞を固定化することができる。以下に、細胞外電位の測定に適した電極を備えた細胞外電位測定装置のうち、本実施形態で用いられる細胞外電位測定装置の構成を図面を用いて説明する。

【0036】

（細胞外電位測定装置）

図2は、本実施形態の細胞外電位測定装置の細胞固定化器19を含む部分の断面図である。図3は図2のA-A断面から下方向を見た図である。図4は、細胞外電位測定装置の概略を示す構成図である。ただし、図2はセンサ基板16上に細胞が固定化されている状態（すなわち図1（c）に示す状態）を示すが、図3は細胞が固定化される前の状態（すなわち図1（b）に示す状態）を示す。また、図3は、センサ基板16裏面に形成されているリード線9を点線で示す。

【0037】

細胞固定化器19は電極11を備えたセンサ基板16及び溶液保持部17とからなる。センサ基板16は基板1上に電極11及びリード線9が形成された構成である。電極11はその表面が露出しており、リード線9は外部接続部10を除いてその表面が絶縁層3で被覆されている。好ましくは、さらにリード線9の外部接続部10は、被覆層21でコートされ、耐久性を有する構成とする。被覆層21は、外部接続部10が曝される周囲の雰囲気に応じて、かかる雰囲気に対して耐性の強い材料を選択するようにする。

【0038】

基板1材料としては、単結晶シリコン、アモルファスシリコン、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素などに代表される半導体材料およびシリコン・オン・インシュレータ（SOI）などに代表されるこれら半導体材料の複合素材、もしくは、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスファイト、炭化ケイ素、酸化ケイ素、窒化ケイ素の群から選ばれる無機絶縁材料、もしくは、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート（PET）、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート（PC）、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリル・ブタジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニレンオキサイドおよびポリスルホン等の群から選ばれる有機材料が挙げられる。好適に用いられる材料は、単結晶シリコン、SOI、PET、PCである。

【0039】

電極 11 には、白金、白金黒、金、パラジウム、ロジウム、銀、タングステンの群から選ばれる金属材料が好適に用いられる。これらの材料を層状に堆積させてもよい。さらに、電極 11 材料として、酸化チタン、酸化スズ、酸化マンガン、酸化鉛、ITO（インジウム錫酸化物）の群から選ばれる金属酸化物材料を用いることもできる。電極 11 は、さらに導電性高分子によって被覆しても良く、また、単分子膜によって被覆してよい。

【0040】

電極 11 と接続するリード線 9 にも、上記と同様の電極材料が適用できる。本実施形態で用いられるセンサ基板 16 の作製方法としては、同時に多数のセンサ基板 16 を作製する以下の方法が用いられる。

【0041】

上記電極材料を上記基板材料からなる基板 1 上に蒸着した後、フォトリジストを用いてエッチングすることにより、電極 11、および対応するリード線 9 を 1 セットとしてかかるセットを複数セット有する所望のパターンを形成する。なお、電極のパターン形成は、その他に、予め電極パターンを形成させたステンシルマスクを通じて蒸着するマスク法や、リフトオフ法も適応できる。その後、外部接続部 10 を除くリード線 9 部分を絶縁層 3 で被覆した後、ダイシングし、所定角の小片に切り出し、一つの小片を上記センサ基板 16 とする。一つの小片には、電極 11 及びリード線 9 が 1 セット形成されているようにする。

【0042】

上記所望のパターンは、各小片の略中心に一つの電極 11 が形成されるものとし、電極 11 の形状は、代表的には正方形もしくは円形であって、1 辺の長さ、もしくは直径は約 1 ～ 2000 μm の範囲にあり得る。

【0043】

リード線 9 を被覆し絶縁するための絶縁層 3 の材料としては、ポリイミド（PI）樹脂、エポキシ樹脂などの樹脂が挙げられる。ネガティブフォトセンシティブポリイミド（NPI）などの感光性樹脂が好ましい。感光性樹脂の材料を用いると、例えば、フォトエッチングによるパターン形成を利用して、電極 11 上の

絶縁層 3 部分に孔を開けて、該電極 11 のみを露出させることが可能となる。このように、絶縁層 3 は、各電極 11 上及びリード線 9 の外部接続部 10 を除いて、基板 1 のほぼ全面を被覆するように設けられることが、生産効率などの点で好ましい。

【0044】

上記センサ基板 16 は、細胞外電位測定装置におけるものであり、センサ基板 16 上での細胞培養を容易にするための構造が加えられており、細胞固定化器 19 として提供されているものである。

【0045】

電極 11 上での細胞培養のために、センサ基板 16 上に、絶縁層 3 を介して培養液 5 を保持し得る溶液保持部 17 が付加されている。本実施形態における保持構造は、アクリル製の円筒状の枠 4 が、電極 11 を囲むようにセンサ基板 16 上に設置されている。枠 4 の内側が、細胞培養領域となる。電極 11 表面への細胞の固定化は、以下に示す本発明の固定化方法によるが、細胞の固定化方法の工程の一つである所望パターンにマスク層 12 を形成する形成工程の後、上記枠 4 の設置を行う。

【0046】

細胞固定化器 19 においては、図 2 に示すように参照電極 13 が設置され、電極 11 からの電気信号は、参照電極 13 の電位を基準として測定される。通常、参照電極 13 は、その表面積が電極 11 の表面積以上であり、好ましくは電極 11 の表面積より大きく、金、白金、銀—塩化銀などの材料で作製されたものであるが、任意の大きさ及び形状であり得る。また、参照電極 13 は、培養液 5 に浸漬していればよく、図示しないが枠 4 の内壁に取り付けられているものであってもよい。

【0047】

細胞固定化器 19 は、特に複雑な装置を必要とせず、一对の電極 11、13 からの信号を検出し得る検出装置とつなぐことによって、細胞外電位測定装置を構成し得るものである。かかる細胞外電位測定装置においては、細胞の細胞膜電位または細胞膜電位の変化を、細胞外電位変化による電圧の変化として測定し得る

。

【0048】

また、細胞固定化器 19 は、配線を介して刺激信号付与装置および出力信号処理装置と組み合わせることにより、電極 11 上に固定化された細胞に電氣的刺激を与え、その応答としての出力信号を処理する図 4 に示すような細胞外電位測定装置 40 として提供され得る。図 4 は、細胞外電位測定装置 40 の概略を示す構成図である。

【0049】

細胞外電位測定装置 40 において、出力信号処理装置は、適切な測定用ソフトウェアを備えたコンピュータ 39 によって一体として構成される。刺激信号付与装置 34 から配線 37 を通して印加される刺激信号は、刺激信号付与装置 34 で刺激条件が設定される。もしくは、適切な測定用ソフトウェアを備えたコンピュータ 39 によって刺激条件が設定される。測定用ソフトウェアは、コンピュータの画面上に、刺激条件などを設定し得るパラメータ設定画面、細胞から検出された電位変化を記録し、リアルタイムで表示し得る記録画面、および記録されたデータを解析し得るデータ解析画面などを与える。好ましくはコンピュータ 39 からの刺激信号は、D/A 変換器を介して電極 11 へと出力され、そして細胞からの出力信号は、信号増幅装置 33 によって増幅され、周波数帯域を制限された後、A/D 変換器を介してコンピュータに入力される。配線 37 は、刺激信号付与用のものであり、配線 32 は、出力信号検出用のものである。

【0050】

さらに、細胞外電位測定装置 40 は、細胞固定化器 19 に設けられている電極 11 を撮像もしくは観察する撮像装置 35、細胞固定化器 19 を所定の温度、ガス濃度、湿度に保つための測定環境調節装置 36、細胞固定化器 19 内の溶液 5 を所定の量となるように注入もしくは排出する溶液駆動装置 38 等を備えるものであってもよい。

【0051】

細胞外電位測定装置 40 は、刺激信号付与装置から刺激信号を与えることなく細胞において発生する自発電位のみの測定も行うことができるものである。

【0052】

(細胞の固定化方法)

上記センサ基板16の電極11上に、本発明の方法を用いて細胞を固定化する方法について説明する。まずセンサ基板16の最表面のうち、電極11を除き少なくともその周囲を包含する領域にマスク層12を形成する。このとき、マスク層12は、後の工程で枠4を設けることとなる領域にはかからないように形成する。

【0053】

マスク層12は、好適には感光性材料が用いられるが、絶縁層3とは異なる材料であり、かつその除去条件下において絶縁層3が除去されないような材料を用いるようにする。好ましくは、アルカリ溶液により除去され、加熱により細胞有害成分を除去できる材料がよい。例えば、ポリイミド樹脂を含有する感光性材料を用いることができ、このような材料として、CRC-8300（商品名 住友化学社製）、RN-901（商品名 日産化学社製）等が挙げられる。

【0054】

マスク層12に、感光性材料を用いることにより、フォトリソグラフィによるパターン形成を利用して、センサ基板16表面の電極11を含む広範な領域にマスク層3を形成した後、センサ基板16上の電極11部分に孔を開けて、該電極11表面を露出させることが可能となる。

【0055】

マスク層12形成工程の後、上述したように、培養液を保持する枠4を電極11を囲むようにセンサ基板16上に設置する。

【0056】

その後、センサ基板16最表面のうち枠4内の領域に固定化材7を固定化する。固定化材7には、強塩基性もしくは強酸性官能基を持つ高分子が好適に用いられる。具体的には、ポリエチレンイミン（PEI）、ポリオルニチン（PO）、ポリリジン（PL）等の正荷電性ポリマーが好適に用いられる。正に荷電したこれらのポリマーは、負に荷電した細胞を引き付ける効果を持つ。同様に、細胞接着能を有し、固定化材7として好適に用いられるものとして、ビグアニド基、も

しくはカルバモイルグアニジド基を持つ高分子が挙げられる。具体的にはアリルビグアニド-*c o*-アリルアミン (PAB)、アリル-N-カルバモイルグアニジノ-*c o*-アリルアミン (PAC) が好適に用いられる。

【0057】

固定化材7の固定化は、上記の材料を所定の濃度で溶解させた溶液を、電極11上に曝し、所定時間経過の後、電極11の表面から取り除き、表面を洗浄液で少なくとも1回以上洗浄し、乾燥することにより行う。固定化材7は、電極11の上面だけに誘電体溶液をスポットし、固定してもよい。

【0058】

その他の固定化材7として、細胞接着性のタンパク質等のマトリクス材料を用いることができるが、この場合マトリクス材料の塗布は公知の方法による。

【0059】

次に、溶液保持部17内に培養液5を満たす。培養液5としては、20mM～400mMの塩化ナトリウムを主成分とする生理食塩水溶液、および種々の栄養素、成長因子、抗生物質などを含有する培地、所定の化学物質、化合物、薬剤を溶解させた緩衝溶液などが好適に用いられる。

【0060】

その後、培養液5内に、所望の細胞を播種し、細胞の培養が進行すると同時に、付着性細胞が、固定化材7を介して、センサ基板16最表面に固定化される。細胞の固定化後、培養液5をマスク層12が剥離する条件とし、しばらく放置することにより、マスク層12を自発的に剥離させることができる。

【0061】

以上、図2、図3を用いてセンサ基板16上に一つの電極11のみが形成されている細胞固定化器19を示したが、図5に示すように、センサ基板16上に複数の電極11とこれに対応するリード線9が形成されているものであってもよい。図5は、細胞固定化器19の構成を示す特定断面から下方向を見た図であり、かかる特定断面は図3における断面と同一である。図5は、6行6列の格子状の各交点に電極11が配置されている構成である。図5は、枠4を省略して示す。図5に示す構成において、枠4は各電極11毎に設置する構成、複数の電極11

毎に設置する構成いずれであってもよい。各電極 11 毎に枠 4 を設置する構成は、例えば各電極 11 上に固定された細胞の薬品応答性を測定する際に有用であり、複数電極 11 毎に枠 4 を設置する構成は、例えば各電極 11 上に固定化した神経細胞間でネットワークを形成させることができ、ネットワークに関する解析を行う際に有用である。図 5 に示すセンサ基板 16 を用いた場合であっても、上述した細胞の固定化方法を用いることができる。

【0062】

第3の実施形態

本実施形態は、第2の実施形態とは異なる構成のセンサ基板 16 を備えた細胞外電位測定装置にかかるものである。図6は、本実施形態の細胞外電位測定装置の細胞固定化器 19 の構造を模式的に示す断面図である。図7は図6のB-B断面から下方向を見た図である。ただし、図6は細胞固定化器 19 に細胞6が固定化されている状態（すなわち図1（c）に示す状態）を示すが、図7は細胞6が固定化される前の状態（すなわち図1（b）に示す状態）を示す。また、図7において、センサ基板 16 の裏面に形成されているリード線 9 を点線で示す。

【0063】

本実施形態の細胞固定化器 19 は、図2に示すものとは、センサ基板 16 の構成が異なるのみであるので、センサ基板 16 以外の構成の説明は省略する。

【0064】

センサ基板 16 は貫通孔 14 を有する。貫通孔 14 により、生体試料が密着して保持される。貫通孔 14 の形状は、目的の生体試料が保持されるものであれば特に制限されない。図6においては、上面開口部が下面開口部より大きい円筒状の貫通孔 14 とする。貫通孔 14 のサイズは、目的の生体試料に依存した任意の大きさを採用し得、目的の生体試料が保持される大きさであれば特に制限されないが、代表的にはセンサ基板 16 上面での開口部の直径が $5 \sim 100 \mu\text{m}$ の範囲にあり、下面開口部の直径が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ の範囲にあり、好適な例示としては生体試料として用いる細胞の長径が略 $30 \mu\text{m}$ の場合、上面開口部の直径が略 $20 \mu\text{m}$ 、下面開口部の直径が略 $5 \mu\text{m}$ 、深さが略 $15 \mu\text{m}$ である。

【0065】

貫通孔 14 の形成方法は、基板 1 材料によって異なるが、例えば基板 1 が P E T である場合には、エキシマレーザを用いて形成することができる。また、例えば基板 1 が S i ウェハである場合には、エッチングにより形成することができる。

【0066】

さらに、貫通孔 14 を下方から細胞吸引手段に連結することにより、貫通孔 14 における細胞の保持をより強固なものとすることができ、浮遊性の細胞であっても貫通孔 14 に保持することができる。

【0067】

センサ基板 16 において、貫通孔 14 の孔壁面 14 a および孔の開口部周縁 14 b には、電極 11 が形成されている。電極 11 は、真空蒸着法あるいはスパッタ法を用いて電極材料を貫通孔 14 の孔壁面 14 a および開口部周縁 14 b に付着させることにより形成する。センサ基板 16 の裏面には、電極 11 に接続するようにリード線 9 が形成されている。

【0068】

以上、図 6、図 7 を用いてセンサ基板 16 上に一つの電極 11 のみが形成されている細胞固定化器 19 を示したが、図 8 に示すように、センサ基板 16 上に複数の電極 11 とこれに対応するリード線 9 が形成されているものであってもよいのは、第 2 の実施形態と同様である。図 8 は、細胞固定化器 19 の構成を示す特定断面から下方向を見た図であり、かかる特定断面は図 7 におけるものと同じである。図 8 は、6 行 6 列の格子状の各交点に電極 11 が配置されている構成である。図 8 は、枠 4 を省略して示す。

【0069】

本実施形態においても、第 2 の実施形態に示した細胞の固定化方法を用いて細胞を所望の位置に固定化することが可能である。

【0070】

【実施例】

以下、本発明をより具体的に例示する。これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

【0071】

実施例 1

実施例 1 は、上記第 1 の実施形態における実施例である。基板 1 として S O I ウェハーを、マスク層 12 の材料として R N 9 0 1 を、固定化材 7 として P E I 及びコラーゲン (S i g m a P - 4 5 1 1) を、固定化対象の生物試料 6 として、ラット大動脈由来平滑筋細胞 V S M C s A - 1 0 (A T C C N o . C R L - 1 4 7 6) を用いた。

【0072】

まず、4 インチ S O I ウェハーを 110℃で 5 分間脱水ベイクした。その後、R N 9 0 1 を 300 r p m で 5 秒間、3500 r p m で 30 秒間スピンコートした。スピンコートしたウェハーを 80℃で 10 分間プリベイクした後、直径 100 μ m の円状パターンを露光し、現像した。現像後のウェハーを 150℃で 5 分間ベイクした後、170℃で 60 分間、350℃で 60 分間さらにベイクした。かかるベイク工程において、沸点が略 300℃以下である有害成分が除去された。

【0073】

ベイク後、R N 9 0 1 をパターンニングしたウェハーを 70% E t O H で洗浄した。そのウェハー上に、溶液保持部を形成するための枠を設置し、0.1 重量% P E I を 3 時間 コートし、その後、滅菌水で十分にリンスした。そして、細胞接着性タンパク質であるコラーゲン (S i g m a P - 4 5 1 1) を所定の方法により 37℃で 30 分間で ウェハーにコートした。

【0074】

その後、溶液保持部内を培養液で満たし、ラット大動脈由来平滑筋細胞 V S M C s A - 1 0 (A T C C N o . C R L - 1 4 7 6) をウェハー上に播種した。培養液は、H E P E S 緩衝 D M E M + 10 重量% F B S を用いた。37℃、C O ₂ の濃度が 5 重量% の環境下で 4 日間 培養した。その後、ウェハーを C O ₂ の濃度が 5 重量% の環境から出し、低 C O ₂ 濃度雰囲気下で 37℃を保つように放置した。4 日後、ウェハーからマスク層 12 が剥離した。注意深く、剥離膜を取り除いたところ、直径 100 μ m 内のみに細胞が固定化された円状パターンが観測

された。

【0075】

マスク層が剥離したときの培養液のpHを測定したところ、7.9だった。培養中、培養液はCO₂の濃度が5重量%の環境下にあるため、pHは略7.4で中性に保たれていた。マスク層は、上記のように、培養液が大気中に放置され、pHの値がアルカリ側に変化したことにより剥離したものである。

【0076】

尚、マスク材料として上記RN901に代えて、CRC8300を用いて同様の実験を行った。この場合、マスク層は低CO₂濃度雰囲気下に放置してから7日後にウェハーから剥離した。

【0077】

実施例2

実施例2は、上記第2の実施形態における実施例である。

【0078】

(図5に示すセンサ基板の作製)

まず、4インチSiウェハー上にフォトリジストをスピンコートする。6行6列の格子状の各交点に直径5 μ mの円形の電極11が位置し、かつ電極11の中心間距離が20 μ mであり、各電極11から放射状に広がるリード線9を有するパターンを複数、Siウェハーの所定の位置に露光し、現像した。そのウェハーの全面に真空蒸着法により金薄膜を堆積させた。その後、リフトオフにより、Siウェハー上に金電極のパターニングが完了した。そして、リード線9部のみに専用現像液を要する絶縁材料であるネガティブ感光性ポリイミド樹脂UR-8300(東レ社製)で被覆した後、ダイシングし、40mm角の小片に切り出した。各小片は、中心に6行6列で直径5 μ mの円形電極が露出し、電極11から引き出されたリード線9が、四方周囲に配置された配線引出し端子に連通した構成であった。このように作製した各小片を、センサ基板16とした。

【0079】

(細胞の固定化)

上記のように作製したセンサ基板上にCRC8300を800rpmで10秒

間、4000 rpmで30秒間スピコートした。スピコートしたセンサ基板を110℃6分間プリベイクした後、電極に対応する直径5 μ mの円状パターン（6行6列）を露光し、現像した。現像後のウェハーを150℃にて5分間ベイクした後、300℃で40分間、450℃で40分間さらにベイクした。

【0080】

その後、CRC8300をパターニングしたセンサ基板を70% EtOHで洗浄した。その基板の上に、溶液保持部を構成する枠4を枠内に全電極11を含むように設置し、枠4内を培養液5で満たした。そして、ラット大動脈由来平滑筋細胞VSMCs A-10 (ATCC No. CRL-1476) を播種した。培養液5は、HEPES緩衝DMEM+10重量% FBSを用いた。37℃でCO₂の濃度が5重量%の環境下で7日間培養した。その後、テトラメチルアンモニウム (TMAH) 溶液を培養液内に注入したところ、センサ基板上からマスク層が剥離した。注意深く、剥離膜を取り除いたところ、電極表面のみに細胞が固定化されている直径5 μ mの円状パターンが観測された。

【0081】

尚、絶縁層3に用いたUR-8300は、上記マスク層が剥離した条件では剥離しないものであった。また、CRC8300は有害成分として沸点203℃の γ ブチロラクトンを含有するものであるが、203℃より高温でベイクを行なったことにより、かかる有害成分は気化し、除去された。したがって、かかる有害成分が、細胞に影響を与えることはなかった。

【0082】

マスク層が剥離したときの培養液のpHを測定したところ、8.1だった。培養中、培養液はCO₂の濃度が5重量%の環境下にあるため、pHは略7.4で中性に保たれていた。マスク層は、上記のように、培養液にTMAHを注入し、培養液をアルカリ性に変化させたことにより剥離したものである。

【0083】

実施例3

本実施例では、実施例2と同様の方法で電極が8行8列に配されたセンサ基板を作製、細胞を固定化した。尚、固定化対象として、胎生17日目のラット大脳皮

質より、当業者に公知の方法を用いて調製した神経細胞を用いた。センサ基板への播種濃度は、 5×10^4 細胞/ml の濃度とした。播種後、そのままの状態です5時間培養した後、マスク層を剥離し、その後2週間培養したところ、電極上の神経細胞間でネットワークが再構成していることを確認した。このとき神経細胞は、5～10個の細胞でクラスターを形成し、クラスター間でネットワークが構成されていた。尚、ネットワークが再構成されていることの確認は、顕微鏡観察により行った。

【0084】

再構成された神経細胞ネットワーク上の一つのクラスターの一つの細胞に50 μ A の双極性の100 μ 秒定電流刺激を印加し、その刺激の伝達を残り63個のチャンネルより測定した。その結果を図9に示す。図9は、各チャンネルで表示したコンピュータの画面のプリントアウトを示すものであり、各チャンネルにおける横軸は時間、縦軸は電圧（すなわち細胞の活動を表す電位の強さ）を示す。刺激を印加した電極はチャンネル38である。図9より、円で囲んだチャンネル、つまり63個中24個に連動した信号の伝達を観測できた。

【0085】

【発明の効果】

本発明によると、微小かつ複雑な領域であっても生体試料を精度良く固定化することができる。したがって、本発明の方法は、生体試料の各種機能を応用したスクリーニング技術やデバイス作製の開発に大きく貢献しうるものである。

【0086】

また、生体試料のパターニングの最終工程はマスク層の分離によるため、生体試料として神経細胞を用いる場合は、細胞成長に合わせたタイミングで生体試料のパターニングが可能となり、神経細胞のネットワーク研究に有用な状態で固定化された生体試料を提供することができる。

【0087】

さらに、本発明の方法により、細胞の電気生理的活動計測用の電極上のみに神経細胞を固定化することができ、電極上のみに固定化された神経細胞間で形成されたネットワークを観察することができるので、従来よりネットワークの詳細な

解析が可能となる。例えば、従来の方法によると、電極上でない領域にも細胞が固定化されることがあるため、伝達信号の伝達経路の詳細な解析は困難であったが、本発明では、かかる解析が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の生体試料の固定化方法を模式的に示す図。

【図 2】 第 2 の実施形態の細胞外電位測定装置を模式的に示す部分断面図。
。

【図 3】 図 2 の A - A 断面から下方向を見た図。

【図 4】 第 2 の実施形態の細胞外電位測定装置の構成を示す概略図。

【図 5】 第 2 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す特定断面から下方向を見た図。

【図 6】 第 3 の実施形態の細胞外電位測定装置を模式的に示す部分断面図。
。

【図 7】 図 6 の B - B 断面から下方向を見た図。

【図 8】 第 3 の実施形態のセンサ基板の改変例を示す特定断面から下方向を見た図。

【図 9】 実施例 3 における測定結果を示す図。

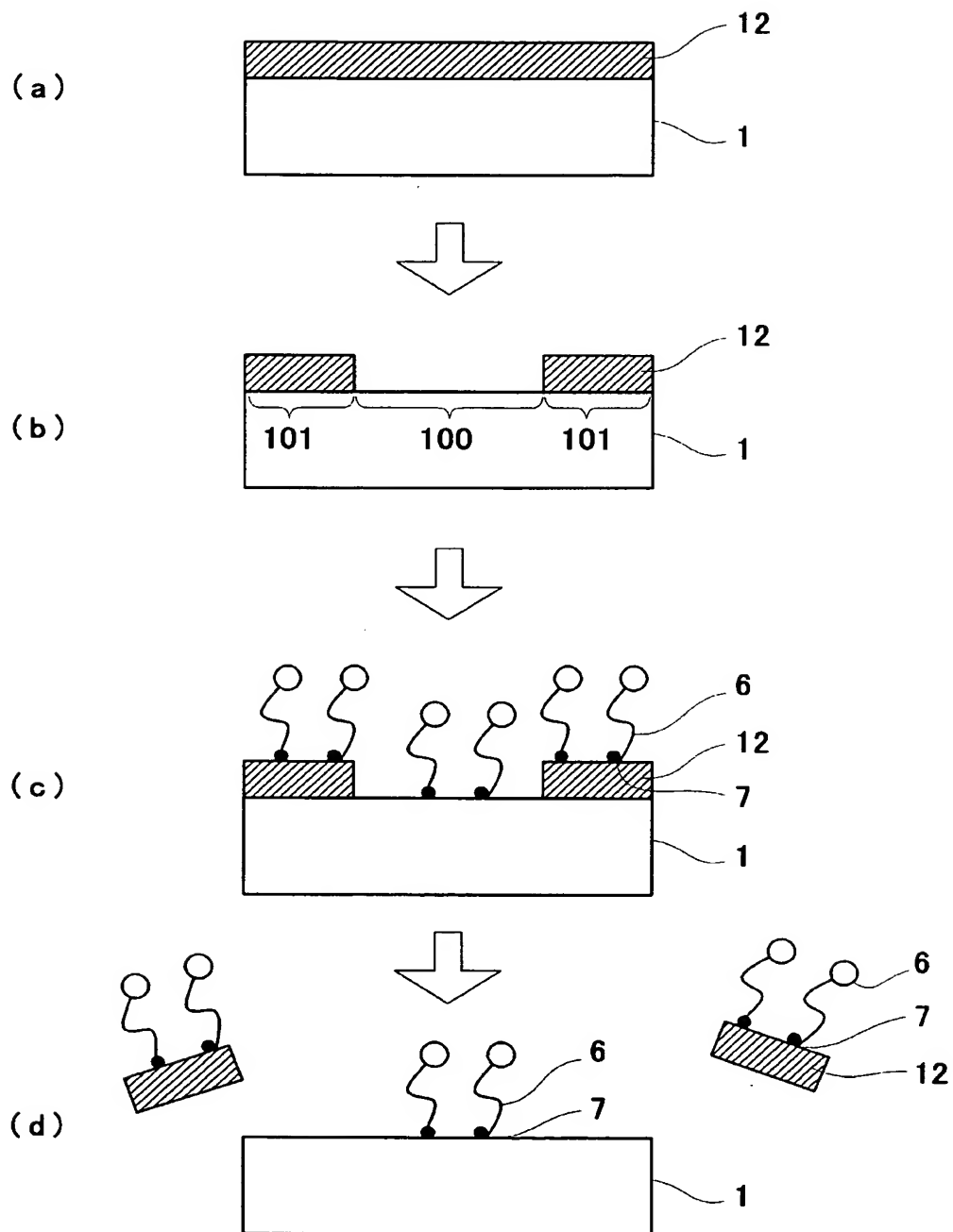
【符号の説明】

- 1 基板
- 4 枠
- 5 培養液
- 6 生体試料
- 7 固定化材
- 9 リード線
- 1 1 電極
- 1 2 マスク層
- 1 3 参照電極
- 1 4 貫通孔
- 1 6 センサ基板

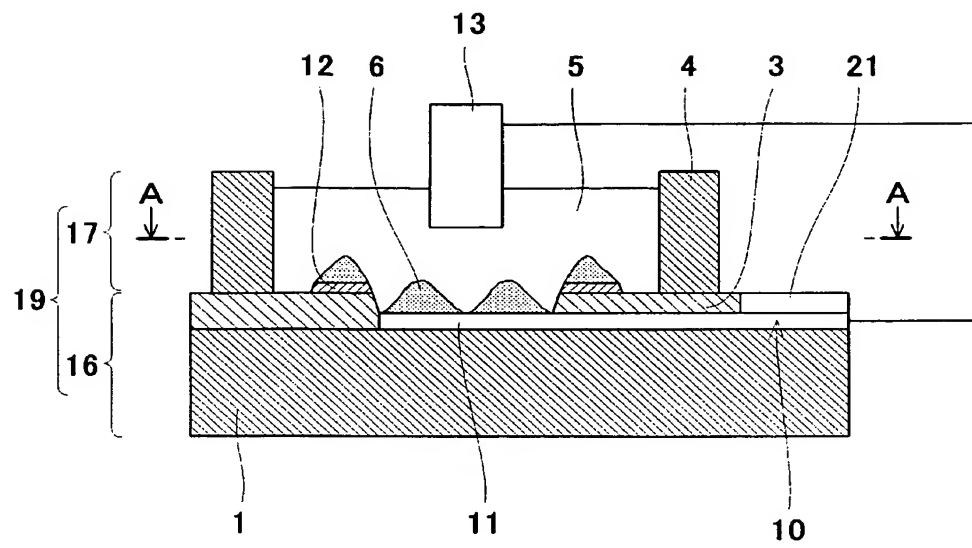
- 1 7 溶液保持部
- 1 9 細胞固定化器
- 3 3 信号増幅装置
- 3 4 刺激信号付与装置
- 3 5 撮像装置
- 3 6 測定環境装置
- 3 8 溶液駆動装置
- 3 9 コンピュータ
- 4 0 細胞外電位測定装置

【書類名】 図面

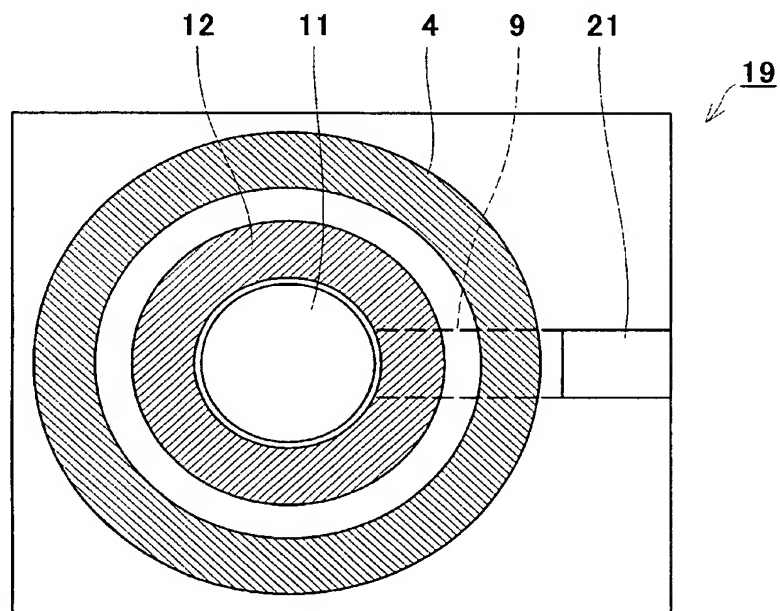
【図 1】



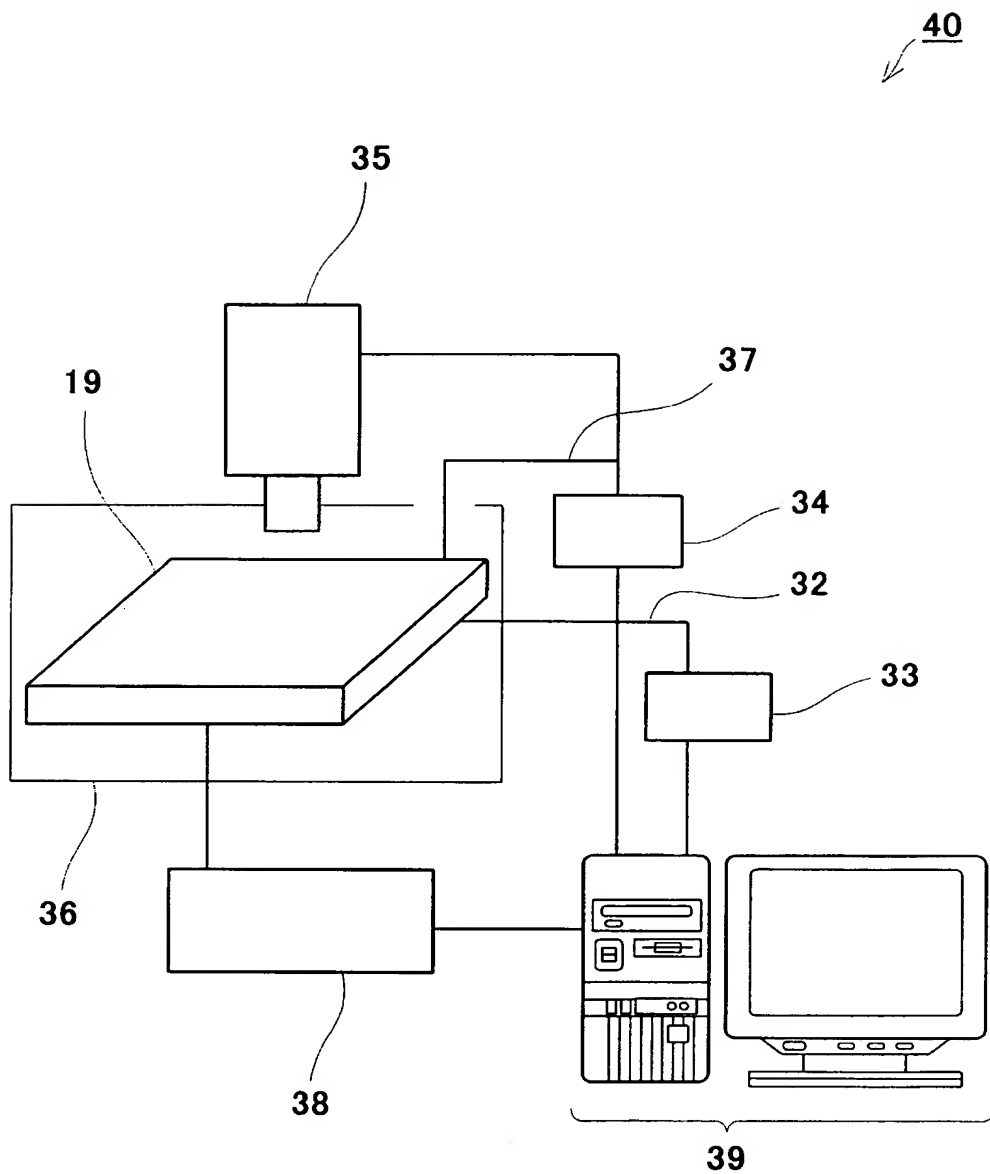
【図 2】



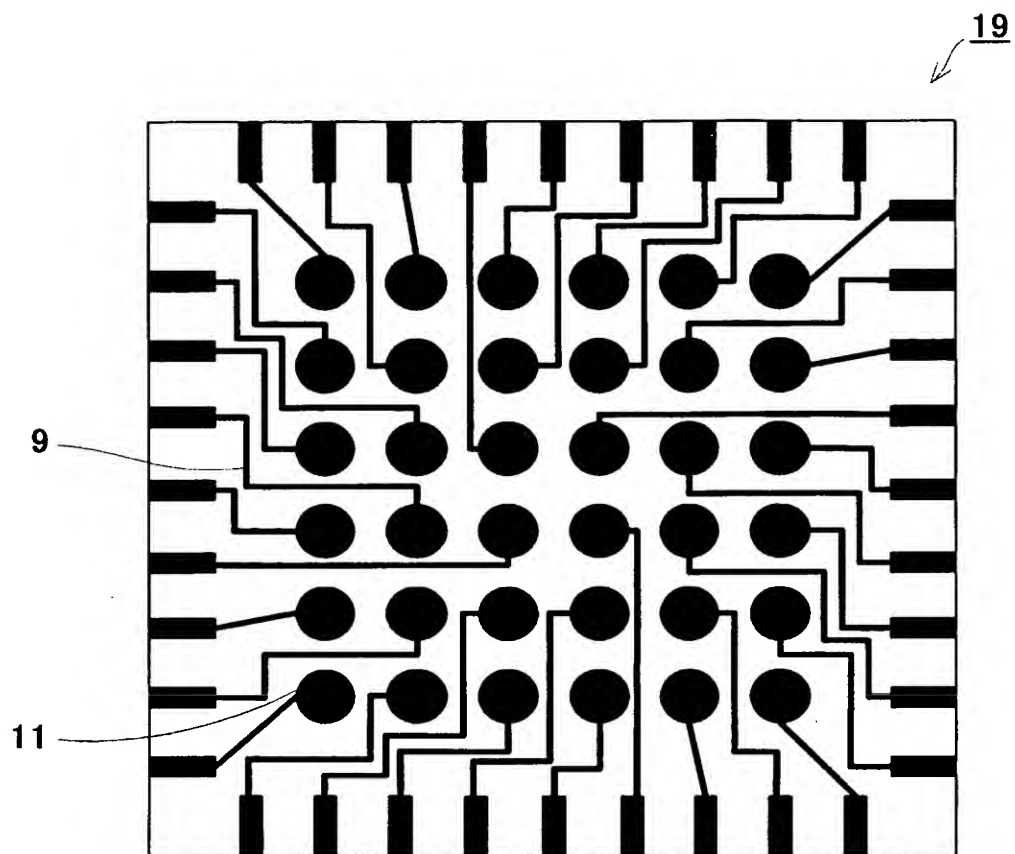
【図 3】



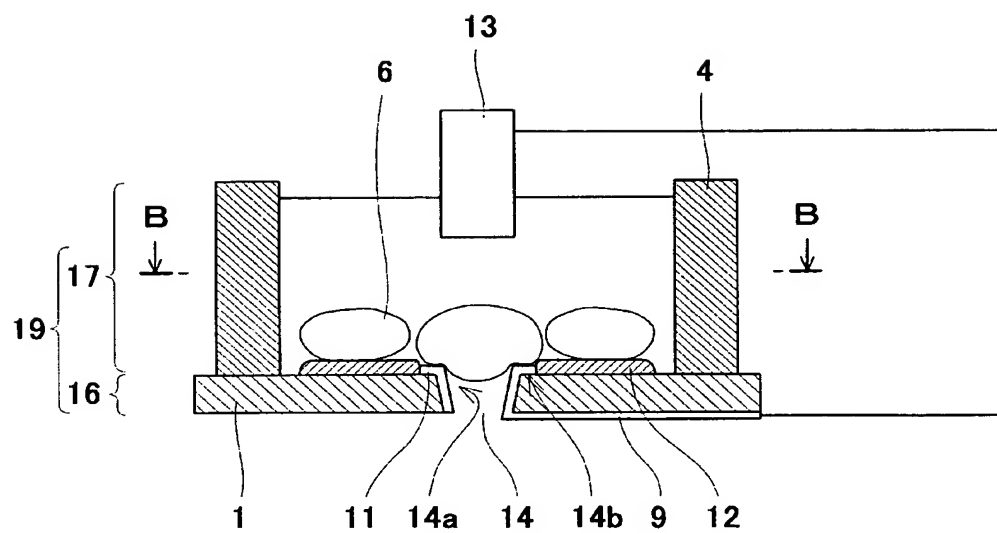
【図 4】



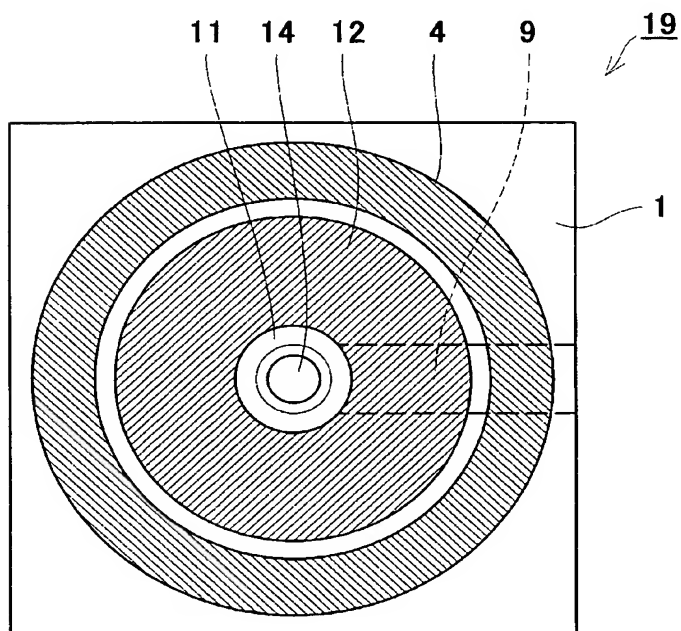
【図 5】



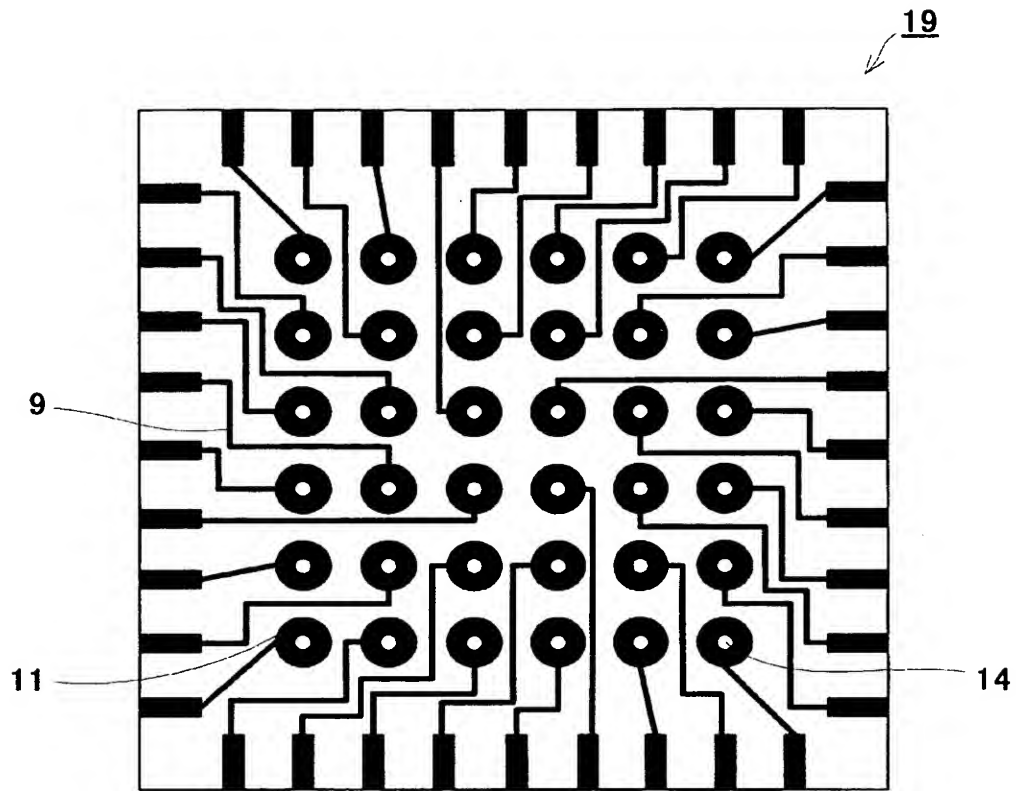
【図 6】



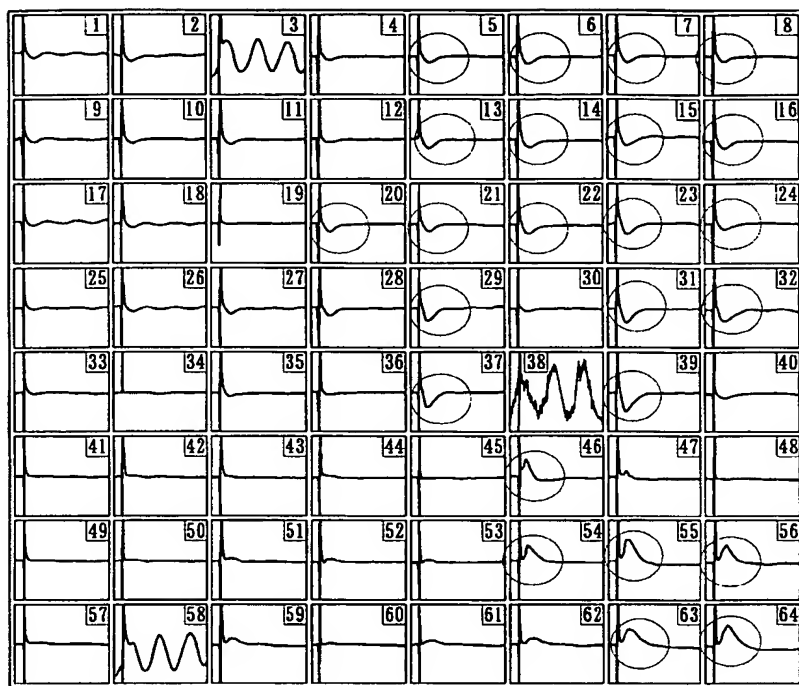
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微小であつたり複雑なパターンの領域であつても生体試料を高精度に固定化できる生体試料の固定化方法を提供する。

【解決手段】 生体試料 6 を基体 1 表面の所望の領域に固定化する方法であつて、（a）基体 1 表面の一部にマスク層 12 を形成するマスク層形成工程、（b）前記マスク層形成工程の後、生体試料 6 を基体表面とマスク層表面とからなる固定化媒体最表面に固定化する固定化工程、（c）前記固定化工程の後、前記マスク層 12 を基体 1 から分離する工程、とを含み、かつ、前記マスク層 12 は、処理条件に応じて基体から分離できるマスク材料で形成される生体試料の固定化方法。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 1 3 0 6 3
受付番号	5 0 2 0 1 6 2 4 8 9 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 1 0 月 2 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年10月28日
【特許出願人】	
【識別番号】	000005821
【住所又は居所】	大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地
【氏名又は名称】	松下電器産業株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100065868
【住所又は居所】	兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所
【氏名又は名称】	角田 嘉宏
【選任した代理人】	
【識別番号】	100088960
【住所又は居所】	兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所
【氏名又は名称】	高石 ▲さとる▼
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106242
【住所又は居所】	兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所
【氏名又は名称】	古川 安航
【選任した代理人】	
【識別番号】	100110951
【住所又は居所】	兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所
【氏名又は名称】	西谷 俊男
【選任した代理人】	
【識別番号】	100114834
【住所又は居所】	兵庫県神戸市中央区東町 1 2 3 番地の 1 貿易ビル 3 階 有古特許事務所

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】	ル 3 階有古特許事務所
	幅 慶司

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 1 3 0 6 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名

松下電器産業株式会社